

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

Receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

Box No. I TITLE OF INVENTION *Snail, a new marker for tumour invasion and target protein of new antitumoral compounds.*

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

*Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/Serrano, 117
28006 - MADRID
SPAIN*

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

91 585 50 00

Facsimile No.

91 585 52 87

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

*Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
Ctra. Colmenar Viejo, km 15
28049 - MADRID*

This person is:

☒ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

*Djeda García, Pedro
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/Serrano, 113
28006 - MADRID*

Telephone No.

91 585 52 76

Facsimile No.

91 585 52 87

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III OTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Cano García, Amparo
Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
Ctra. Colmenar Viejo, km 15
28049 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Nieto Tolédano, M^{te} Angela
Insto. Neurobiología Ramón y Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C/Doctor Arce, 37
28002 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Rodrigo Castro, M^{te} Isabel
Insto. Investigaciones Biomédicas Alberto Sols
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C/Arturo Duperier, 4
28029 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Locascio, Annamaria
Insto. Neurobiología Ramón y Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C/Doctor Arce, 37
28002 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

ITALY

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

García del Barrio, María
 Insto. Neurobiología Ramón y Cajal
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 C/Doctor Arce, 37
 28002 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Blanco Fernández de Valderrama, María José
 Museo Nacional de Ciencias Naturales
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 C/ José Gutiérrez Abascal, 2
 28006 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Portillo Pérez, Francisco
 Universidad Autónoma de Madrid
 Ciudad Universitaria de Cantoblanco
 Cta. Colmenar Viejo, Km 15
 28049 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Pérez Moreno, Mima Alicia
 Insto. Investigaciones Biomédicas Alberto Sols
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 C/Arturo Duperier, 4
 28029 - MADRID SPAIN

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia |
| <input type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia & Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BZ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> MZ Mozambique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DZ Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☐ Any other state which is party to the PCT

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 01.07.1999	P9910466	ES		
item (2)				
item (3)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY			
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):	Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
ISA / ES			

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING	
This international application contains the following number of sheets: request : 5 description (excluding sequence listing part) : 15 claims : 3 abstract : 1 drawings : 6 sequence listing part of description : Total number of sheets : 30	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify):
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: SPANISH

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT	
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).	
Ojeda García, Pedro	

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received: 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) Fecha de publicación internacional
11 de Enero de 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/02860 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/574, 33/50

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00226

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de Junio de 2000 (27.06.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9901466 1 de Julio de 1999 (01.07.1999) ES

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo
US*): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES). UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
MADRID [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco,
Ctra. Colmenar Viejo, Km 15, E-28049 Madrid (ES).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): CANO
GARCIA, Amparo [ES/ES]; Universidad Autónoma
de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Ctra.
Colmenar Viejo, Km 15, E-28049 Madrid (ES). NIETO
TOLEDANO, María Angela [ES/ES]; Insto. Neurobi-
ología Ramón y Cajal, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Calle Doctor Arce, 37, E-28002 Madrid (ES).
RODRIGO CASTRO, María Isabel [ES/ES]; Insto. In-
vestigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior
de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4,
E-28029 Madrid (ES). LOCASCIO, Annamaria [IT/ES];
Insto. Neurobiología Ramón y Cajal, Consejo Superior
de Investigaciones Científicas, Calle Doctor Arce, 37,
E-28002 Madrid (ES). GARCIA DEL BARRIO, Marta
[ES/ES]; Insto. Neurobiología Ramón y Cajal, Consejo

Superior de Investigaciones Científicas, Calle Doctor
Arce, 37, E-28002 Madrid (ES). BLANCO FERNAN-
DEZ DE VALDERRAMA, María José [ES/ES]; Museo
Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Calle José Gutiérrez Abascal,
2, E-28006 Madrid (ES). PORTILLO PÉREZ, Fran-
cisco [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad
Universitaria de Cantoblanco, Ctra. Colmenar Viejo, Km
15, E-28049 Madrid (ES). PEREZ MORENO, Mirna,
Alicia [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas Alberto
Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES).

(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Su-
perior de Investigaciones Científicas, Calle Serrano, 113,
E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BE, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), patente OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicada:

- Con informe de búsqueda internacional.
- Antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicado si se reciben modifica-
ciones.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: SNAIL, NEW TUMORAL PROGRESSION MARKER AND TARGET PROTEIN OF NEW ANTITUMORAL COM-
POUNDS

(54) Título: SNAIL, NUEVO MARCADOR DE PROGRESION TUMORAL Y PROTEINA DIANA DE NUEVOS COMPUES-
TOS ANTITUMORALES

(57) Abstract: The transcription factor Snail has been identified as a repressor of the expression of cadherine E. The expression of
Snail induces invasive and metastatic capacity in tumoral cells. The present invention discloses a new target protein. Snail, for the
identification of new antitumoral compounds and it also discloses a new prognostic marker for tumors, indicative of tissue invasion
and metastatic capacity.

(57) Resumen: Se ha identificado el factor de transcripción Snail como un represor de la expresión de cadherina E. La expresión de
Snail induce capacidad invasiva y metastática en células tumorales. La presente invención presenta: una nueva proteína diana, Snail,
para la identificación de nuevos compuestos antitumorales y, un nuevo marcador de pronóstico de tumores, indicativo de invasión
tisular y capacidad metastática.

WO 01/02860 A1

TITULO

SNAIL, NUEVO MARCADOR DE PROGRESIÓN TUMORAL Y PROTEINA DIANA DE NUEVOS COMPUESTOS ANTITUMORALES.

SECTOR DE LA INVENCION

Biomedicina. Proteínas diana de compuestos antitumorales.

Sistema de identificación de candidatos a compuestos antitumorales

Marcadores de invasión y metástasis tumorales, su uso como marcadores de pronóstico de la enfermedad y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos.

ESTADO DE LA TECNICA

La proteína cadherina E no sólo se ha comprobado que media en la adhesión intercelular de células epiteliales durante el desarrollo embrionario y en los tejidos adultos, sino que además está implicada en la transformación fenotípica que se observa en los tumores epiteliales durante su progresión a tumores invasivos. En este proceso de invasión de las células tumorales la expresión de la proteína cadherina E se reduce o se anula y esta pérdida se asocia con la adquisición de propiedades migratorias. Las alteraciones funcionales de cadherina E y/o sus proteínas asociadas, cateninas, han sido asociadas con una menor diferenciación y mayor agresividad tumoral [Takeichi, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 806-811 (1993); Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 11-26 (1994)] e incluso se han visto implicadas en la transición de adenomas a carcinomas invasivos [Peri, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb & Christofori, G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193 (1998).]. Por todo ello, el gen de la cadherina E ha sido considerado como un gen supresor de la invasión tumoral [Frixen, U. H., et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 173-185 (1991); Vleminckx, K., Vakaet, L. J., Mareel, M., Fiers, W. & Van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by

epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119 (1991); Miyaki, M. et al.. Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11, 2547-2552 (1995); Llorens, A. et al. Downregulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linkend to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.* 78, 1-12 (1998).] por lo que los mecanismos moleculares que controlan su expresión o función son de suma importancia en el conocimiento de los procesos tumorales invasivos.

La expresión del gen de la cadherina E está regulada por varios elementos localizados en la región 5' proximal de su promotor [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11495-11499 (1991); Ringwald, M., Baribault, H., Schmidt, C. & Kemler, R. The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic Acids Res.* 19, 6533-6539 (1991); Bussemakers, M. J., Girolodi, L. A., van Bokhoven A. & Schalken, J. A. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1284-1290 (1994); Girolodi, L. A. et al. Role of E-boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 453-458 (1997)]. Entre ellos, destaca el elemento E-pal que contiene dos cajas E, identificado en el promotor de la cadherina E de ratón (entre las posiciones -90 a -70) y que actúa como represor en células normales y transformadas deficientes de cadherina E [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11495-11499 (1991); Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 595-602 (1996); Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor

progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999)]. Los factores de transcripción que interactúan con este elemento o en la región correspondiente del promotor del gen de cadherina E humano [Bussemakers, M. J., Girolidi, L. A., van Bokhoven A. & Schalken, J. A. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1284-1290 (1994); Girolidi, L. A. et al. Role of E-boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 453-458 (1997)] son desconocidos.

Los factores de transcripción potenciales represores de la expresión del gen de la cadherina E podrían ser de gran utilidad en la identificación de nuevos candidatos antitumorales que actuaran inhibiendo la función de estos factores, y por tanto del proceso invasivo y metastásico. Además, su presencia podría utilizarse como marcadores de progresión y malignidad tumoral.

DESCRIPCION

Descripción resumida

Se ha identificado el factor de transcripción Snail como un represor de la expresión de cadherina E, actuando por interacción directa con la caja E2 del elemento E-pal del promotor. La expresión ectópica de Snail en células epiteliales induce la transición epitelio-mesénquima y la adquisición de propiedades migratorias concomitante a la inhibición de la expresión de cadherina E y la pérdida de otros marcadores de diferenciación epitelial. La presente invención presenta, y forman parte de ella:

- una nueva proteína diana para la identificación de nuevos compuestos antitumorales, y
- un nuevo marcador de invasión y metástasis tumoral y su uso como marcador de pronóstico de la enfermedad y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos.

Descripción detallada

Snail es un factor de transcripción que actúa como represor directo de la expresión de cadherina E.

La identificación de los factores de transcripción que interaccionan con el elemento E-pal se realizó mediante una aproximación tipo híbrido sencillo ("one-hybrid") usando la secuencia E-pal de ratón (-90/-70) oligomerizada para dirigir la expresión del gen HIS3 de *S. cerevisiae* como cebo y una genoteca de cDNA de NIH3T3 fusionada al dominio de activación GAL4 como presa. Se aislaron 130 clones capaces de interaccionar con (y dirigir la transcripción del gen testigo HIS3) la construcción que contiene el elemento E-pal nativo y que no reconocieron el elemento oligomérico mutado. Esta forma mutada del elemento E-pal contiene 2 bases cambiadas (TT en lugar de GC) que eliminan la caja E2. Esta forma mutada ha sido descrita como responsable de la eliminación del efecto represor en el promotor de la cadherina E de ratón [Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 595-602 (1996); Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997)].

La secuenciación de los clones aislados permitió identificar que un 49% de los mismos contenían insertos que codificaban para la secuencia completa o parcial del cDNA de Snail de ratón [Nieto, M. A., Bennet, M. F., Sargent, M. G. & Wilkinson, D. G. Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila snail* gene. *Development* 116, 227-237 (1992); Smith, D. E., Del Amo, F. F. & Gridley, T. Isolation of *Sna*, a mouse homologous to the *Drosophila* gene snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development* 116, 1033-1039 (1992)], mientras que un único clon codificaba para una secuencia parcial del cDNA de Slug de ratón.

Para determinar el efecto de Snail como un factor de transcripción en el contexto de la región proximal del promotor de cadherina E (-178/+92), se subclonó la secuencia completa del cDNA de Snail en un vector de expresión (pcDNA3) y se analizó su actividad por cotransfección en dos líneas celulares de queratinocitos epidérmicos de ratón, MCA3D

y PDV. Ambas líneas habían sido caracterizadas previamente por el alto nivel de expresión de cadherina E y de la actividad del promotor [Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999); Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991)]. La cotransfección de Snail en células MCA3D (Fig. 1A) y PDV (Fig. 1B) produjo una fuerte represión del promotor nativo de cadherina E (95% y 75%, respectivamente), pero no del promotor que contiene la caja E2 mutada (Fig. 1). Estos resultados confirman los obtenidos por el método de screening one-hybrid y demuestran que Snail es un represor directo de la transcripción del gen de la cadherina E actuando a través de su unión a la caja E2 del elemento E-pal.

Snail induce la conversión fibroblástica de células epiteliales y la adquisición de migración

Para proporcionar más datos sobre el papel de la proteína Snail en la regulación del gen de la cadherina E y su participación en la transición epitelio-mesénquima, se expresó ectópicamente en varias líneas celulares. La expresión transitoria de Snail se analizó inicialmente en las líneas de queratinocitos MCA3D y PDV, que presentan la ventaja de su capacidad de crecer en grupos aislados estableciendo fuertes contactos intercelulares mediados por cadherina E incluso a baja densidad, y exhiben muy baja motilidad celular [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991); Lozano, E. & Cano, A. Cadherin/catenin complexes in murine epidermal keratinocytes: E-cadherin complexes containing either b-catenin or plakoglobin contribute to stable cell-cell contacts. *Cell Adh. Commun.* 6, 51-67 (1998); Gómez M., Navarro P. & Cano A. Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotype. *Invasion & Metastasis*

14,17-26 (1994); Frontelo, P. et al. Transforming growth factor $\beta 1$ induces squamous carcinoma cell variants with increased metastatic abilities and a disorganized cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 244, 420-432 (1998)]. La sobreexpresión de Snail eliminó los contactos intercelulares en las 24-48 horas después de la transfección en ambos tipos celulares como consecuencia de la inhibición de la expresión de cadherina E (Fig. 2 b y 2 f) y de otras proteínas asociadas, como plakoglobina. Simultáneamente a estos cambios, la morfología de las células transfectadas con Snail se encuentra profundamente alterada. En ambas líneas celulares se observaron abundantes prolongaciones de membrana y largos filamentos asemejando "filopodia".

La expresión estable de Snail se realizó en la línea celular MDCK, la cual exhibe un fenotipo epitelial "prototípico" y en cultivo se dispone en una monocapa. Este fenotipo no se ve afectado por la expresión del vector control en seis clones independientes aislados (Fig. 3 a), que mantienen la expresión de cadherina E (Fig. 3 b) y de plakoglobina (Fig. 3 c) en los contactos intercelulares. Sin embargo, la expresión estable de Snail induce una dramática conversión a un fenotipo fibroblástico completamente indiferenciado. Las células MDCK transfectadas con Snail pierden la capacidad de crecer como una monocapa y de su inhibición por contacto. En su lugar, estas células forman redes creciendo unas sobre otras con extensiones de membrana extremadamente largas (Fig. 3 d). El análisis de la expresión de cadherina E y plakoglobina mostró la pérdida de ambas moléculas en las células MDCK transfectadas con Snail (Fig. 3 e, f). Adicionalmente, la expresión estable de Snail en las células MDCK indujo un fuerte comportamiento migratorio, lo que se comprobó mediante ensayos de migración en heridas inducidas en los cultivos (Fig. 4).

Snail se expresa en tumores indiferenciados y en zonas de invasión de carcinomas epidermoides.

El análisis de la expresión endógena de Snail por RT-PCR en un panel de líneas celulares que varían en la expresión de cadherina E mostró una correlación inversa entre la expresión de ambas moléculas y una asociación de la expresión de Snail con la capacidad invasiva y metastásica de las mismas (Fig. 5). La cadherina E se observó en la línea celular epitelial, no tumoral MCA3D y en la línea celular tumoral PDV, que a pesar de su origen

tumoral no presenta capacidad invasiva ni metastásica. Sin embargo, en ninguna de ellas se constató la presencia de Snail. Por el contrario, en las líneas celulares tumorales con capacidad invasiva y metastásica, HaCa4 y Carb, la ausencia de cadherina E se asociaba con la presencia de Snail.

La expresión de Snail se analizó mediante hibridación in situ en tumores epidermoides inducidos en ratones inmunodeprimidos bien por las diferentes líneas, bien por tratamiento químico en la piel del ratón. En ambos casos, se observó una alta expresión de Snail en tumores indiferenciados (Fig. 6f, h) y en zonas de invasión de carcinomas epidermoides (Fig. 6 i) que han perdido la expresión de cadherina E (Fig. 6 k). Por el contrario, no se detectó expresión de Snail en tumores bien diferenciados no invasivos (Fig. 6 b, 6 d).

En conjunto, estos datos muestran que Snail es un represor directo de la expresión de cadherina E, implicado en la transición epitelio-mesénquima que ocurre durante la invasión tumoral. Por tanto, la presencia de Snail es un nuevo marcador de progresión tumoral, específicamente asociado a la adquisición del fenotipo invasivo y metastásico, lo que permite su uso como un marcador pronóstico de tumores humanos y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos antitumorales, y que forma parte de la presente invención.

Además, estos datos indican claramente el papel inductor directo de Snail en la adquisición de estas características de invasión y metástasis tumoral por lo que Snail puede considerarse una proteína diana de nuevos compuestos antitumorales. A partir de esta proteína se pueden elaborar ensayos para la identificación de nuevos candidatos antitumorales basados en líneas celulares transformadas por la proteína Snail y en donde el análisis de la regulación de la expresión de Snail por un candidato antitumoral identificaría nuevos compuestos antitumorales, y que forman parte de la presente invención. El análisis de la regulación de la expresión de Snail podría realizarse mediante la determinación de la presencia o no Snail tras el contacto con el candidato antitumoral, o también a través de otro tipo de señal de la inhibición de la función de Snail en células transformadas con genes testigo, ej. HIS3 y LacZ, y que forman parte de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Snail reprime la actividad del promotor de la cadherina E en líneas celulares epiteliales. Células MCA3D (Fig. 1A) y PDV (Fig. 1B) se transfectaron con el promotor nativo de Cadherina E (wt-178) o con una versión mutada (mE-pal) fusionada al gen marcador CAT en presencia de 1(µg de vector pcDNA3 control o conteniendo Snail. La gráfica presenta los niveles de actividad CAT del promotor. La actividad del promotor se expresa como medida relativa a la del promotor nativo en presencia del vector control.

Figura 2.- La expresión transitoria de Snail en queratinocitos epidérmicos induce pérdida de cadherina E y plakoglobina y pérdida de adhesión célula-célula. Se transfectaron células MCA3D (a-d) y PDV (e-h) con vector control (mock, a,c,e,g)) o conteniendo el cDNA de Snail (b,d,g,h) y se analizó la presencia de cadherina E y plakoglobina por inmunocitoquímica visualizada por microscopía confocal a las 48 horas.

Figura 3.- La transfección estable de Snail en células epiteliales MDCK induce una conversión epitelio-mesénquima concomitante con la pérdida de cadherina E y plakoglobina. Imágenes de contraste de fases de células transfectadas con el vector control (a) y con el vector conteniendo Snail (d). Imágenes de microscopía confocal que muestran expresión de cadherina E (b, e) y plakoglobina (c, f) en células control y transfectadas con Snail, respectivamente.

Figura 4.- Snail induce un fenotipo migratorio en células epiteliales. El comportamiento migratorio se analizó en un modelo de herida in vitro. Los cultivos de células MDCK controles (mock) o transfectadas con Snail se arañaron con una punta de pipeta y se tomaron fotografías inmediatamente (t=0, a, d) y 10 horas después (b, e).

Figura 5.- Análisis de la expresión, endógena de Snail por RT-PCR en un panel de líneas celulares. La expresión endógena de Snail se correlaciona inversamente con la de cadherina E en líneas celulares de queratinocitos de ratón normales y transformadas.

Figura 6.- La expresión de Snail se asocia a carcinomas invasivos y a áreas de invasión en carcinomas epidermoides. Se indujeron tumores en ratones desnudos con células PDV (a-d) o CarB (e-h) o por tratamiento químico (i-l). Se analizaron por hibridación in situ con sondas para cadherina E (a,c,e,g,i,k) o para Snail (b,d,f,h,j,l). Cadherina E se expresa en áreas diferenciadas de los carcinomas epidermoides (a,c,i,k), mientras que en estos tumores no se aprecia expresión de Snail (b,d,j). Los carcinomas invasivos no expresan cadherina E (e,g) y expresan Snail (f,h). En tumores inducidos químicamente, se observa expresión de Snail en áreas indiferenciadas invasivas (l, que no expresan cadherina E (k).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento del cdna de snail de raton utilizando la metodologia del híbrido sencillo

El oligonucleótido que contiene la secuencia del elemento E-pal del promotor de cadherina-E (CD-E) de ratón (nucleótidos de -90 a -70) conteniendo dianas para los enzimas de restricción Sall en 5' y XhoI en 3' se concatenó en sentido directo hasta un total de 6 repeticiones completas mediante ligación con técnicas habituales, aislamiento en geles de poliacrilamida y clonaje en el vector pHISi (Clontech, Palo Alto, CA) que contiene el gen testigo HIS3 de *S. cerevisiae*, y elementos de replicación de levadura y bacterias y genes de selección apropiados. De esta forma la expresión del gen HIS3 queda bajo el control del elemento E-pal concatenado. La correcta inserción de las secuencias reguladoras se comprobó mediante PCR, digestión con enzimas de restricción apropiados y secuenciación. El vector "cebo" así generado se denominó pHIS-E6. El mismo método se utilizó para generar vectores en los que se introdujo una versión mutante del elemento E-pal, también concatenado 6 veces en sentido directo, en la que los dos oligonucleótidos centrales, GC, fueron sustituidos por TT. Al vector "cebo" mutante generado se le denominó pHIS-mE6. Los vectores cebo pHIS-E6 y pHIS-mE6 se integraron independientemente en el locus cromosómico URA3 de la cepa de levadura YM4271 (Clontech, Palo Alto, Ca) mediante técnicas habituales de transformación y selección de estirpes estables que mantienen el crecimiento en presencia de 20 mM 3-aminotriazole (3ATZ). Las estirpes seleccionadas se denominaron E-pal HIS3 (construcción E-pal nativo)

y mE-pal HIS3 (construcción E-pal mutada). La estirpe de levadura E-pal HIS3 fué sometida a transformación con una genoteca de cDNA comercial de células NIH3T3 que contiene los diferentes insertos de cDNA fusionados al dominio de activación de GAL4 en el vector pACT2 (Clontech, Palo Alto, Ca), amplificada previamente para obtener un título de 3×10^6 clones independientes mediante técnicas habituales. Las levaduras transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en ausencia de Histidina y en presencia de 20 mM 3ATZ, aislándose 300 clones independientes. Los plásmidos conteniendo las diferentes secuencias de cDNA se aislaron de las levaduras transformantes y fueron utilizados posteriormente para transformar E.coli (cepa DH5 α), recuperándose 221 clones independientes de E. coli de los que se aislaron los plásmidos correspondientes. Para eliminar falsos positivos los 221 plásmidos se introdujeron independientemente en paralelo en las estirpes de levadura generadas previamente conteniendo el gen HIS3 bajo el control del elemento E-pal silvestre (estirpe E-pal HIS3) o E-pal mutado (estirpe mE-pal HIS3), seleccionándose aquellos plásmidos que conferían crecimiento en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 20 mM 3ATZ exclusivamente en la estirpe E-pal HIS3, siendo su número total de 130. Los insertos de dichos plásmidos fueron analizados inicialmente mediante digestiones con diversos enzimas de restricción y sometidos a secuenciación en un secuenciador automático. Las secuencias obtenidas se analizaron en bancos de datos de cDNA utilizando el programa BLAST/FASTA. 49% de los clones identificados codificaban para la secuencia total o parcial del cDNA de Snail de ratón.

Ejemplo 2. Transfeccion transitoria y estable de msnail en celulas epiteliales

La secuencia completa del cDNA Snail de ratón (mSnail) contenida en uno de los clones identificados en el screening del híbrido sencillo se aisló del vector pACT2 mediante digestión con los enzimas de restricción EcoRly HindIII y se subclonó en los sitios EcoRI/HindIII del vector pcDNA3 (Invitrogene), que contiene el gen neo que confiere resistencia al antibiótico G418 y se secuenció en los dos extremos. Al vector así generado se le denominó pcDNA3-mSnail.

11

La construcción del promotor de cadherina E de ratón, -178, que contiene las secuencias de -178 a +92 pb del gen fusionadas al gen testigo CAT (Chloramfenicol Acetyl Transferase), y la construcción mEpal (en la que los dos nucleótidos centrales GC del elemento E-pal se mutaron por TT) se han descrito previamente [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11495-11499 (1991); Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 595-602 (1996); Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997)] y fueron cedidas por el Dr. J. Behrens.

a) Análisis de la actividad del promotor de cadherina E

Las células MCA3D y PDV se sembraron a subconfluencia (3×10^5 células/placa de 6 cm de diámetro, P-60) en medio de crecimiento HamF12 conteniendo 10% suero bovino fetal (Gibco) y se incubaron 24 h a 37°C en un incubador conteniendo 5% CO₂ y una humedad del 95%. A continuación, el medio fue reemplazado por medio fresco DMEM, 10% suero bovino fetal manteniéndose en el incubador durante 6 h adicionales. Los cultivos fueron sometidos a cotransfección utilizando Lipofectamina Plus (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando 2.5 µg de la construcción -178, mE-pal o el vector control pCATbasic (carente de secuencias promotoras) (Promega) y en presencia de 1 µg de pcDNA3-mSnail o del plásmido pcDNA3 vacío. Como control adicional, la actividad de las construcciones del promotor de cadherina E se comparó con la del vector pCAT-control (Promega) que contiene el gen testigo CAT bajo el control del promotor de SV-40, por lo que las células se transfectaron en paralelo con dicho vector. La eficiencia de la transfección se analizó por cotransfección en todos los cultivos con 2.5 µg del plásmido CMV-Luc que contiene el gen testigo luciferasa bajo el control del promotor de cytomegalovirus. 24 h después de la transfección el medio fue eliminado y tras lavar con PBS las células se recogieron raspando suavemente las placas y

12

se sometieron a centrifugación (2.000 rpm, 4 min). Los extractos se obtuvieron resuspendiendo el pellet celular en 100 µl de un tampón conteniendo 10 mM Fosfato pH 8.0 y sometidas a 4 ciclos de congelación en N₂ líquido-descongelación a 37°C. La actividad luciferasa se determinó inicialmente en alícuotas de 5 µl utilizando un kit comercial y un luminómetro. Alícuotas de los diferentes extractos conteniendo actividades equivalentes de luciferasa se analizaron para la actividad CAT, utilizando como sustrato C¹⁴-chloramfenicol (Amersham) y como cofactor Acetil-CoA (Sigma) siguiendo el método descrito previamente [Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999)]. La actividad CAT obtenida en células MCA3D y PDV para la construcción -178 del promotor nativo de cadherina E fue el 70% y 50%, respectivamente, de la del vector pCAT-SV40. Las actividades CAT obtenidas se normalizaron a la obtenida con la construcción -178 en presencia del vector vacío pcDNA3 en cada línea celular. Los ensayos de transfección fueron realizados en cultivos duplicados equivalentes de cada una de líneas celulares para todas las condiciones experimentales analizadas.

b) Efecto de la expresión de mSnail en el fenotipo celular y expresión de marcadores epiteliales

Se realizaron transfecciones transitorias con 2 µg de mSnail (vector pcDNA3-mSnail) y controles "mock" (vector vacío pcDNA3) en las líneas de queratinocitos de ratón MCA3D y PDV, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, excepto que las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares (1.2 cm de diámetro) depositados sobre las placas P-60. Al cabo de 24h y 48h tras la transfección los cristales correspondientes a las dos condiciones experimentales de cada línea celular se fijaron con metanol (-20°C) durante 30 s, y se sometieron a análisis de la expresión de cadherina E y plakoglobina mediante inmunofluorescencia [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-

533 (1991)]. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal (Leica)

Transfecciones estables de mSnail y control "mock" se realizaron en la línea epitelial MDCK, crecidas en medio DMEM, 10% suero bovino fetal, en cultivos paralelos y siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A las 48-72 h de la transfección, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, el medio se cambió por medio fresco y se le añadió 400 µg/ml de G418, seleccionándose las células resistentes a G418 al cabo de 2-3 semanas de crecimiento en presencia del antibiótico. La población total generada ("pool") en ambos tipos de cultivos (mSnail y mock) fué recogida y se procedió a la obtención de clones independientes mediante dilución. Para ello se sembraron 100 células de cada tipo de población en placas P-100 (10 cm diámetro) y se crecieron en medio DMEM, 10% suero bovino fetal y 400 µg/ml de G418. Se obtuvieron colonias independientes resistentes a G418 al cabo de 2-3 semanas adicionales, las cuales fueron aisladas por tripsinización utilizando cilindros de clonaje (5 mm de diámetro interno) y amplificadas por sucesivos pases en placas de cultivo de tamaño progresivo (T6->F12.5->F25->F75) manteniendo la presión del antibiótico en todas las fases del cultivo. Se aislaron un total de 10 clones independientes de la transfección de mSnail y 6 clones independientes de la transfección mock. Los diferentes clones fueron analizados para la expresión de cadherina E y plakoglobina mediante inmunofluorescencia (análisis por microscopia confocal) e inmunotransferencia, y para expresión de mSnail mediante RT-PCR tras extracción del RNA-polyA+ de los diferentes clones y el uso de amplímeros adecuados para amplificar un fragmento de 388 pares de bases, según la secuencia del cDNA de mSnail.

Ejemplo 3. Obtención de tumores

a) Tumores inducidos en ratones inmunodeprimidos por las líneas celulares

Los tumores se indujeron en ratones macho atímicos nu/nu de la cepa BalC de 8 semanas de edad mediante inyección subcutánea de células PDV, HaCa4 o CarB como se ha descrito [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991)]. Las diferentes líneas celulares se crecieron a confluencia en botellas F75, se tripsinizaron y

resuspendieron en tampón Fosfato salino (PBS) a una densidad de 1×10^7 células/ml en PBS. Las células se inyectaron subcutáneamente en los dos flancos de cada ratón (1×10^6 células/sitio inyección) utilizando jeringas de insulina y agujas hipodérmicas de 25 gauge. Habitualmente se inoculan 3 animales por cada línea celular (6 sitios de inyección/línea). Los animales se obtuvieron de la unidad de producción de IFA-CREDO (France) y se mantuvieron en condiciones estériles en la instalación específica para estos animales en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y de acuerdo con las normas institucionales de manejo de animales. Los animales inyectados se observaron 3 veces por semana, determinándose la aparición de los tumores por inspección visual y medida de su tamaño mediante un calibre. Los animales fueron sacrificados por asfixia en éter cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1.5-2.0 cm de diámetro externo. Los tumores fueron extirpados, una fracción de ellos fijada en formaldehído para posterior análisis histológico, y el resto fue congelado inmediatamente en isopentano enfriado en un baño de nitrógeno líquido directamente o embebidos en OCT (TissueTek). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior utilización.

b) Inducción de tumores en la piel de ratón por carcinogénesis química

Los tumores se indujeron en la piel dorsal de ratones BalC de 8-10 semanas de edad, obtenidos en la unidad de producción del animalario del IIB, mediante el protocolo de dos estadios DMBA/TPA como se ha descrito [Cano, A. et al. Expression pattern of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int. J. Cancer* 65, 254-262 (1996)]. Una semana previa al inicio del experimento, el dorso de los animales (20 en total) fue rasurado, tras lo cual se aplicó tópicamente una dosis única del carcinógeno dimethylben(z)antraceno (DMBA) a una concentración de $50(\mu\text{g/ml})$ disuelto en acetona. Una semana después se inició la promoción mediante aplicación tópica del éster de forbol tetradecanoylphorbolacetate (TPA) a una concentración de $50(\mu\text{g/ml})$ disuelto en etanol. El TPA fue aplicado cada 3 días durante un total de 30 semanas. Los animales se mantuvieron en observación semanal hasta un total de 50 semanas. Al cabo de 10 semanas de tratamiento con TPA se detectó la aparición de los primeros tumores de tipo papiloma que prosiguieron apareciendo a lo largo

15

del tratamiento y posteriormente, obteniéndose una media de 5-6 tumores/ratón. Una pequeña proporción de los papilomas (5%) progresaron tras cesar el tratamiento con TPA hacia carcinomas. Los animales fueron sacrificados a diferentes intervalos y los tumores extraídos y congelados como se ha descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de Snail en el control de tumores, como represor de la expresión de la caderina al interactuar directamente con el elemento E-pal.
2. Uso de Snail según la reivindicación 1 para determinar la capacidad invasiva y metastásica de un tumor epitelial, caracterizado por las siguientes etapas:
 - a) la determinación de la presencia de un marcador pronóstico, Snail, en la muestra biológica obtenida de dicho tumor, y
 - b) la comparación de la presencia de este marcador pronóstico con la ausencia del mismo en una muestra control, y en donde dicha presencia es indicativa de capacidad invasiva y metastásica de dicho tumor epitelial
3. Uso de Snail según la reivindicación 2, caracterizado porque la determinación específica de la presencia de dicho marcador pronóstico Snail se realiza mediante la utilización de anticuerpos específicos anti-Snail generados a partir de proteína Snail.
4. Uso de Snail según la reivindicación 2, caracterizado porque la determinación específica de la presencia de dicho marcador pronóstico Snail se realiza mediante un ensayo de hibridación *in situ* para un precursor genético de dicho marcador pronóstico.
5. Uso de Snail según la reivindicación 2, caracterizado porque la determinación específica de la presencia de dicho marcador pronóstico Snail se realiza mediante ensayo de RT-PCR para un precursor genético de dicho marcador pronóstico, a partir de la extracción de RNA polyA+ de muestras tumorales y tejido control y la amplificación de secuencias codificantes del marcador pronóstico utilizando amplímeros adecuados.
6. Uso de Snail según la reivindicación 1 para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail caracterizado por las siguientes etapas:
 - a) añadir dicho compuesto a las células transformadas con capacidad de expresar el marcador pronóstico Snail,
 - b) determinación de la disminución o eliminación total de la capacidad de expresar dicho marcador de pronóstico en esas células transformadas,

- c) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células transformadas presentan una disminución o eliminación total de la expresión de Snail (y una reversión de sus propiedades invasivas y metastásicas).
7. Uso de Snail según la reivindicación 6 para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail basado en la utilización estirpes de levadura *S. cerevisiae* que expresan el gen HIS3 bajo el control del elemento E-pal en su versión nativa y mutante, y caracterizado por las siguientes etapas:
- a) transformación de las estirpes de levadura con el vector pACT2-mSnail, que contiene la secuencia completa del cDNA de Snail, en presencia y ausencia de dicho compuesto,
 - b) determinación del crecimiento de las levaduras transformadas a partir de la estirpe que expresa el gen HIS3 bajo el control de E-pal nativo en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 3ATZ,
 - c) determinación de la ausencia de efecto inhibitor de dichos compuestos en las levaduras transformadas por pACT2-mSnail (Snail mutado) en estirpes de levadura que expresan el gen HIS3 bajo el control de E-pal nativo en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 3ATZ,
 - d) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células estirpes de *S. cerevisiae* presentan una disminución o eliminación total de su capacidad de crecimiento.
8. Uso de Snail según la reivindicación 6 para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail basado en la utilización estirpes de levadura *S. cerevisiae* que expresan el gen LacZ bajo el control del elemento E-pal en su versión nativa y mutante, y caracterizado por las siguientes etapas:
- a) transformación de las estirpes de levadura con el vector pACT2-mSnail, que contiene la secuencia completa del cDNA de Snail, en presencia y ausencia de dicho compuesto,

- b) determinación de la actividad β -galactosidasa de las levaduras transformadas a partir de la estirpe que expresa el gen Lac Z bajo el control de E-pal nativo,
 - c) determinación de la ausencia de efecto inhibidor de dichos compuestos en las levaduras transformadas por pACT2-mSnail en estirpes de levadura que expresan el gen LacZ bajo el control de E-pal mutado,
 - d) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células estirpes de *S. cerevisiae* presentan una detección positiva de actividad β -galactosidasa.
9. Uso de los compuestos seleccionados según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a la 8 en la elaboración de un producto para procesos patológicos humanos caracterizados por su capacidad de invasión tisular o por su capacidad de metastatizar otros tejidos.
10. Oligonucleótidos caracterizados porque se unen complementariamente al RNA mensajero de Snail humano y bloquean su expresión.
11. Uso de los oligonucleótidos según la reivindicación 10 en la elaboración de un producto para procesos patológicos humanos caracterizados por su capacidad de invasión tisular o por su capacidad de metastatizar otros tejidos.
12. Uso según las reivindicaciones 9 y 11 caracterizado porque dicho proceso patológico es un tumor epitelial.

1/6

Fig. 1A

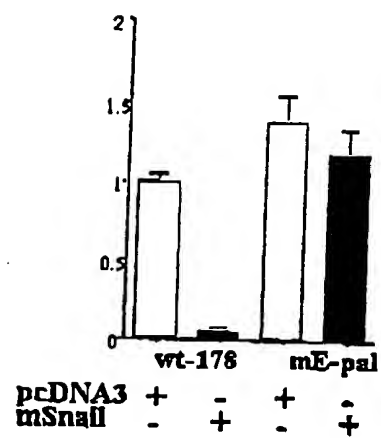


Fig. 1B

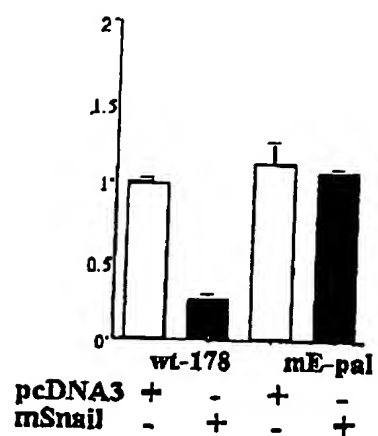


Figura 1

2/6

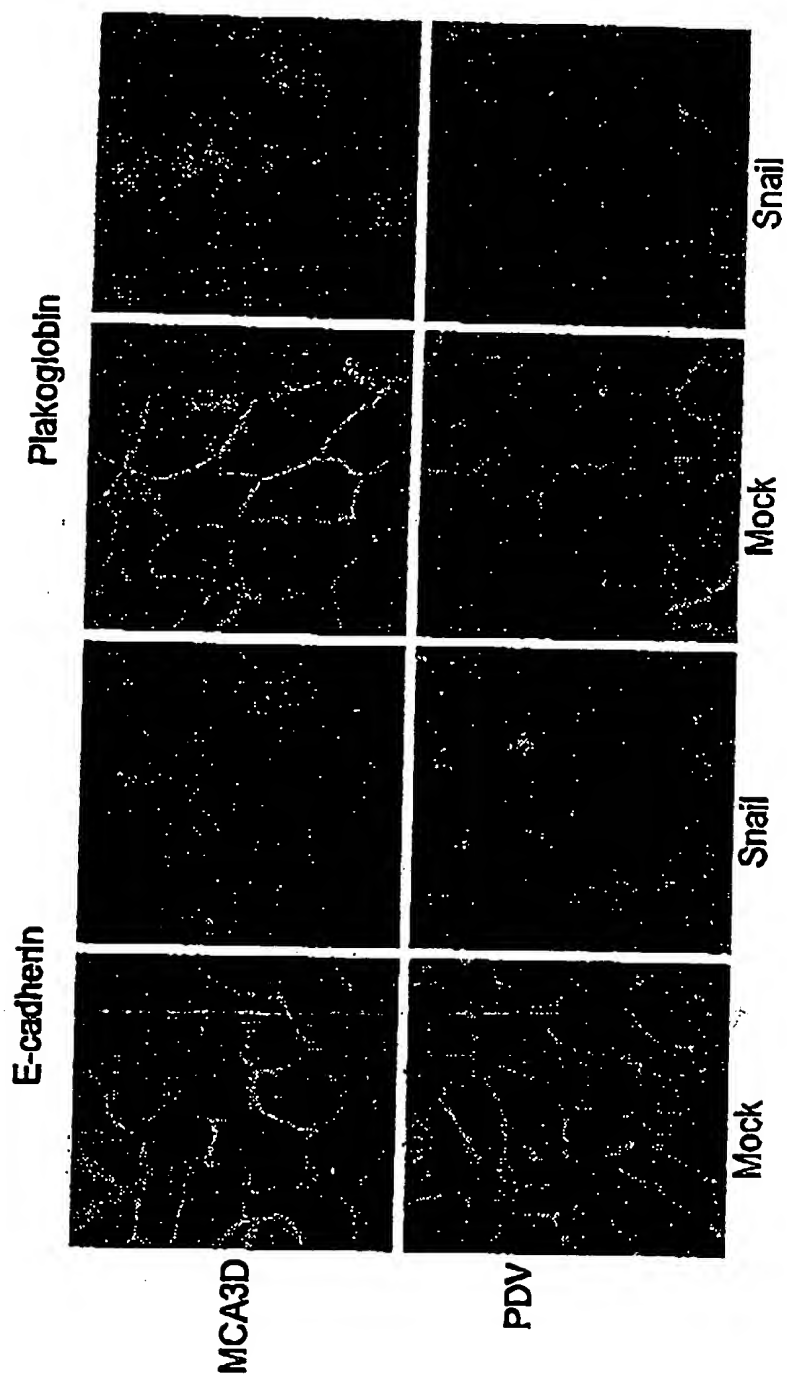


Figura 2

3/6

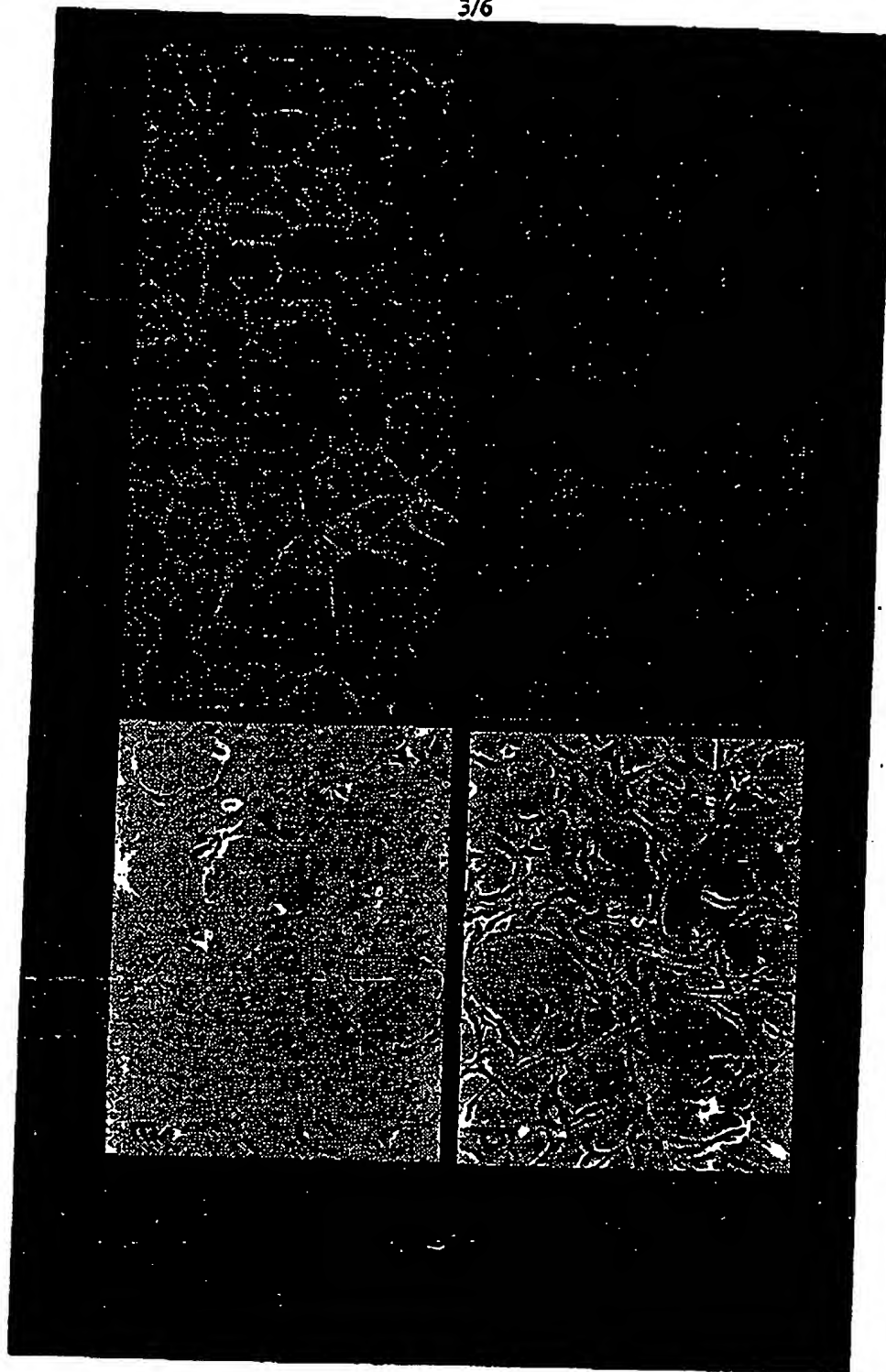


Figura 3

4/6

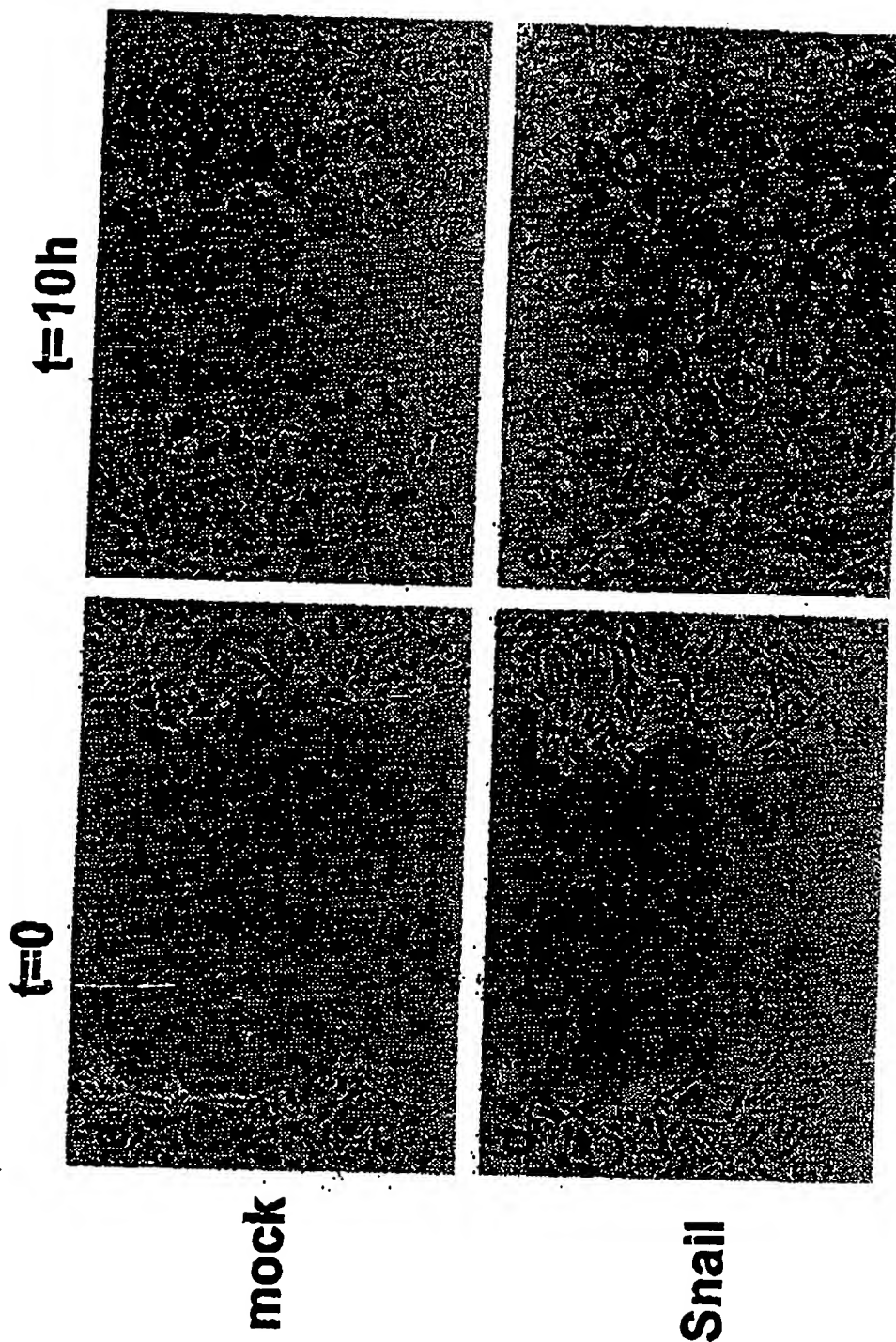


Figura 4

5/6

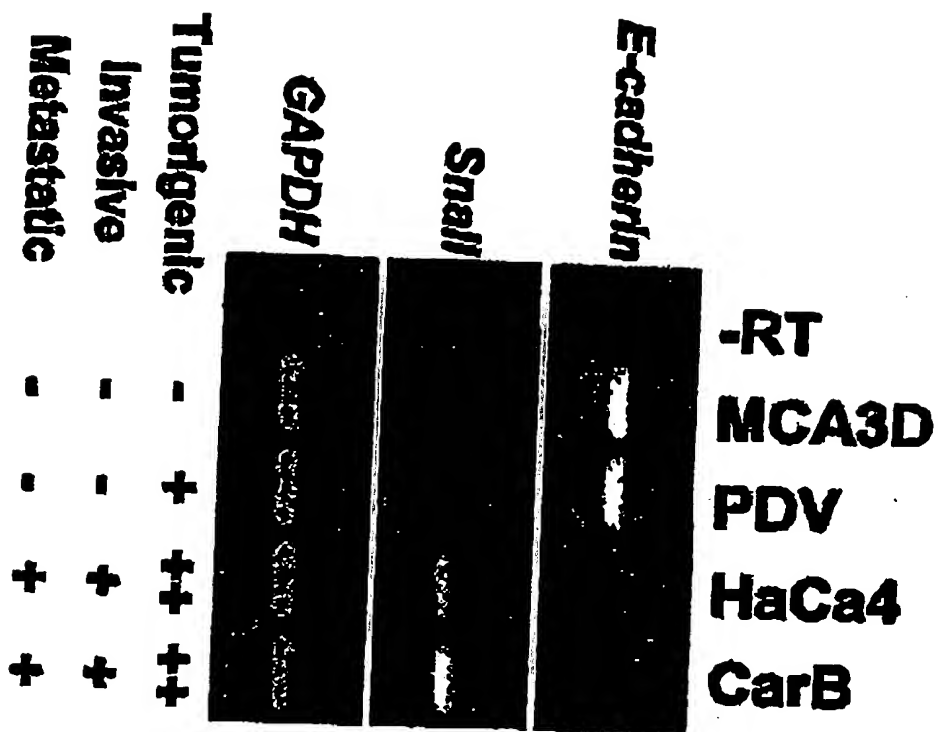


Figura 5

6/6

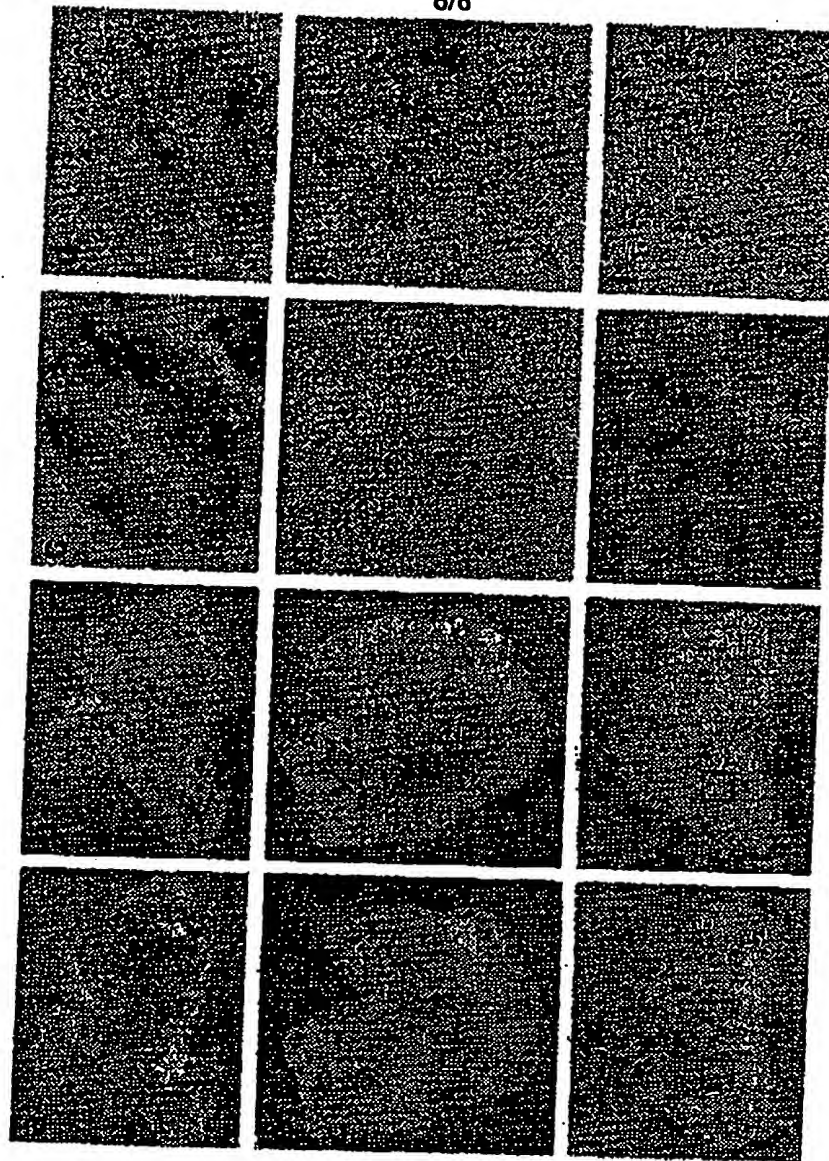


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 00/00226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: G01N 33/574, G01N 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P.X	CANO, A. et al., The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, Nature Cell Biology, February 2000, Vol. 2, pages 76-83.	1-8
P.X	EDUARD BATLLÉ et al., The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells, Nature Cell Biology, February 2000, Vol. 2, pages 84-89.	1-8
Y	HIROKI NAKAYAMA et al., The transition to endoreduplication in Trophoblast Giant Cells is Regulated by the mSNA Zinc Finger Transcription Factor, Developmental Biology, (1998), 199, pages 150-163.	1-8
Y	HIROKI ODA et al., Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during Drosophila Gastrulation, Developmental Biology, (1998), 203, pages 435-450.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

24 November 2000 (24.11.00)

Name and mailing address of the ISA/

S:P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 00/00226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PIERRE SAVAGNER, et al., The Zinc-Protein slug Causes Desmosome Dissociation, an initial and necessary step for Growth factor-induced Epithelial-Mesenchymal Transition, The Journal of Cell Biology, 16 June 1997, vol. 137, pages 1403-1419.	1-8
Y	NAOYUKI FUSE et al., Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by transcriptional repressor encoded by escargot, Genes & Development (1994), 8, pages 2270-2281.	1-8
Y	WO 9920168 A2 (UNIVERSITY OF OTAGO) 29 April 1999, pages 4-6, 21-23.	1-8
Y	WO 9602002 A1 (JACK SCHALKEN) 25 January 1996, pages 2-5, 14.	1-8
A	DAVID E. SMITH, et al., Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the Drosophila genes snail and escargot: its expression suggests multiple roles during postimplantation development, Development (1992), 116, pages 1403-1419. 1039	1-8
A	BUSSEMAKERS M.J.G. et al., Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cells, Biochemical and Biophysical Research Communication, 15 September 1994, vol. 203, No.2, pages 1284-1290.	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES00/00226

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
2. Claims: 1, 9-12
Claim 1: The scope of the expression "utilization of SNAIL in the control of tumors" is unclear. For this reason, the search was directed towards the utilization of SNAIL for determining the invasive and metastatic capacity of an in vitro tumor and its utilization for identifying compounds inhibiting its activity.
Claims 9-12: Lack of technical features.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The International Search Authority has found that this international application contains several inventions as follows:

- Invention 1 (claims 1-5): The utilization of SNAIL for determining the invasive and metastatic capacity of an epithelial tumor.
- Invention 2 (claims 6-8): The utilization of SNAIL for identifying compounds inhibiting its function.
- Invention 3 (claims 9-11): SNAIL inhibiting compounds and the utilization thereof.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/96/00226

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9921068	29.04.1999	US 5886570 AU 9595198 EP 0946911	23.03.1999 10.05.1999 06.10.1999
WO 9602002	25.01.1996	AU 2897195	09.02.1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud inter.onal n°
PCT/ ES 00/00226

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ G01N 33/574, G01N 33/50

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	CANO, A. et al., The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, Nature Cell Biology, febrero 2000, vol. 2, pág. 76-83.	1-8
P,X	EDUARD BATLLE et al., The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells, Nature Cell Biology, febrero 2000, vol. 2, pág. 84-89.	1-8
Y	HIROKI NAKAYAMA et al., The transition to endoreduplication in Trophoblast Giant Cells is Regulated by the mSNA Zinc Finger Transcription Factor, Developmental Biology, (1998), 199, pág. 150-163.	1-8
Y	HIROKI ODA et al., Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during Drosophila Gastrulation, Developmental Biology, (1998), 203, pág. 435-450.	1-8

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "B" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

24 NOV 2000

24. 11. 00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

MARTA HERNANDEZ CUÉLLAR

n° de teléfono + 34 91 349 5545

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1998)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional nº

PCT/ES 00/00226

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	PIERRE SAVAGNER, et al., The Zinc-Protein slug Causes Desmosome Dissociation, an initial and necessary step for Growth factor-induced Epithelial-Mesenchymal Transition, The Journal of Cell Biology, 16 junio 1997, vol. 137, pág. 1403-1419.	1-8
Y	NAOYUKI FUSE et al., Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by transcriptional repressor encoded by escargot, Genes & Development (1994), 8, pág.2270-2281.	1-8
Y	WO 9920168 A2 (UNIVERSITY OF OTAGO) 29 Abril 1999, pág. 4-6.	1-8
Y	WO 9602002 A1 (JACK SCHALKEN) 25 Enero 1996, pág 2-5, 14.	1-8
A	DAVID E. SMITH, et al., Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the Drosophila genes snail and escargot: its expression suggests multiple roles during postimplantation development, Development (1992), 116, pág. 1403-1419.	1-8
A	BUSSEMAKERS M.J.G. et al., Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cells, Biochemical and Biophysical Research Communication, 15 septiembre 1994, vol. 203, nº 2, pág. 1284-1290.	1-8

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (julio 1998)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 00/00226

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°: 1, 9-12 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: Reivindicación 1: no queda claro el alcance de la expresión "uso de SNAIL en el control de tumores" por lo que la búsqueda se ha dirigido al uso de SNAIL para determinar la capacidad invasiva y metastásica de un tumor in vitro y a su utilización para identificación de compuestos que inhiban su actividad.
Reivindicaciones 9-12: falta de características técnicas.
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

- Invención 1 (Reivindicaciones 1-5): Uso de SNAIL para determinar la capacidad invasiva y metastásica de un tumor epitelial.
- Invención 2 (Reivindicaciones 6-8): Uso de SNAIL para identificar compuestos que inhiban su función.
- Invención 3 (Reivindicaciones 9-11): Compuestos inhibidores de SNAIL y su uso.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la primera hoja (1)) (julio 1998)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00226

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9921068	29.04.1999	US 5886570 AU 9595198 EP 0946911	23.03.1999 10.05.1999 06.10.1999
WO 9602002	25.01.1996	AU 2897195	09.02.1996

Formulario PCT/ISA/210 (anexo-familias de patentes) (julio 1998)